

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

SMJER: PROFESOR FIZIKE

Dora Polić

Diplomski rad

**Stohastički model dineinski ovisnih
oscilacija jezgre**

Voditelj diplomskog rada: doc. dr. sc. Matko Glunčić

Zagreb, 2014.

Zahvaljujem se mentoru, doc. dr. sc. Matku Glunčiću, na savjetima, strpljenju te pruženoj prilici i poticanju na samostalan rad.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Nenadu Pavinu te prof. dr. sc. Ivi M. Tolić na usmjeravanju, iznimnoj susretljivosti, konstruktivnim savjetima i svojoj ukazanoj pomoći.

Zahvaljujem se članovima biofizičke grupe profesora Pavina na sudjelovanju u diskusiji i razmatranju modela.

Sažetak

Oscilatorno gibanje jezgre stanice *S. pombe* pred mejozu nužno je za pravilno kromosomsko sparivanje, rekombinaciju genetskog materijala i održivost spora. Vukući mikrotubule dineinski motor uzrokuje navedene oscilacije, gibajući pri tome jezgru naprijed-nazad unutar stanice. Dosadašnji teorijski model aproksimacije srednjeg polja (Vogel *et al.*, 2009) opisuje jezgrine oscilacije bazirajući se na otpuštanju motora s mikrotubula pod utjecajem sile opterećenja te njihovom vezivanju na mikrotubule ovisnom o duljini mikrotubula. Model pretpostavlja velik ukupan broj motora unutar stanice te se služi aproksimacijom srednjeg polja. No, same fluktuacije broja motora su zanemarene. Za mali ukupni broj motora u stanici, ove fluktuacije su značajne te dovode do nepravilnih jezgrinih oscilacija. Kako bismo provjerili događaju li se pravilne oscilacije jezgre uz fluktuaciju broja motora izveli smo računalne stohastičke simulacije temeljene na promatranju ponašanja pojedinog dineinskog motora. Dinamiku sustava opisali smo „master“ jednadžbom određujući pri tome vjerojatnost $P(N_l, N_r, t)$ pronalaženja N_l , odnosno N_r motora vezanih na lijevi, odnosno desni mikrotubul u trenutku t . Budući da postavljenu „master“ jednadžbu nije moguće riješiti analitički, rezultate smo ostvarili numeričkim rješavanjem koristeći pri tome Gillespie algoritam. Izveli smo stohastičke simulacije za različit ukupan broj motora u citoplazmatskom rezervoaru, počevši od velikih vrijednosti broja motora pa sve do samo jednog motora u rezervoaru. Pri velikom broju motora stohastički model pruža dobru podudarnost s modelom aproksimacije srednjeg polja. Nasuprot tome, smanjivanjem ukupnog broja motora, oscilacije gube na periodičnosti te aproksimacija srednjeg polja više nije valjana. Metodom autokorelacije utvrdili smo optimalan raspon broja motora u rezervoaru potreban za pravilne periodične oscilacije jezgre, $N_{uk} = 20 - 40$, koji se slaže s eksperimentalnim mjerenjima. Ustvrdili smo ovisnost raspona optimalnog broja motora o trenju sustava te smo na kraju ispitali parametarski prostor stope priključivanja k_{on} te konstante otpuštanja k_{off} . S obzirom da je citoplazmatski dinein molekularni motor prisutan u mnogim eukariotskim stanicama, okvir koji se koristi u ovom radu ima veliku mogućnost primjene i u drugim organizmima, uključujući i ljude.

Stochastic model of dynein-dependent nuclear oscillations

Abstract

During the meiotic prophase of the life cycle of fission yeast, oscillatory nuclear movement is crucial for proper chromosome pairing, recombination and spore viability. This movement is driven by dynein motors pulling on microtubules, consequently moving the nucleus back and forth inside the cell. A theoretical model (Vogel *et al.*, 2009) of nuclear oscillations, based on load-dependent detachment and microtubule length-dependent attachment of the motors, describes nuclear oscillations using large number of motors and a mean-field approximation. However, fluctuations in the number of active force generators are neglected. For small number of motors these fluctuations become important and lead to noisy oscillations. To verify that oscillations still occur in the presence of force fluctuations, we have performed stochastic computer simulations of individual force generators. We have represented the dynamics of the system by a master equation for the probability $P(N_l, N_r, t)$ of finding a configuration of N_l and N_r particles attached, both to the cell cortex and to the microtubule on the left and the right side of SPB, respectively, at time t . We have obtained our results by solving the equation numerically using Gillespie's algorithm. We have performed computer simulations for a different number of motors, starting with a large number of motors and ending with the situation where only one motor is present. In the limit of a large number of motors, we obtain results similar to those suggested by the mean-field approximation. On the contrary, as the number of particles decreases, the mean-field approximation is no longer valid. Using the method of autocorrelation we have determined the number of motors necessary for robust nucleus oscillations, $N_{uk} = 20 - 40$. We investigated how does friction of system influence oscillatory movement of nucleus. Last, we checked parametric space for attachment rate k_{on} and constant of detachment k_0 . Comparing the results obtained by stochastic simulations to those measured experimentally, we have confirmed validity of our model which can now be used in other scientific experiments conducted on similar biological

systems. As the cytoplasmic dynein is found in many eukaryotic cells, the frame that is used in this paper has a number of applications in other organisms, including humans.

Sadržaj

Uvod	1
1.1. Dineinski uzrokovane oscilacije	1
1.2. Aproksimacija srednjeg polja	3
1.3. Obrazloženje teme	7
Metode	8
2.1. Stohastički model	8
2.2. „Master” jednažba	10
2.3. Gillespie algoritam	15
Rezultati i rasprava	17
3.1. Neograničeni rezervoar	17
3.2. Ograničeni rezervoar	19
3.3. Periodičnost oscilacija s obzirom na ukupan broj motora	22
3.4. Raspon optimalnog broja motora s obzirom na trenje sustava	24
3.5. Periodičnost oscilacija s obzirom na stopu priključivanja, k_{on}	26
3.6. Periodičnost oscilacija s obzirom na konstantu otpuštanja, k_o	28
Metodičko poglavlje	30
Zaključak	35
Literatura	37

Uvod

1.1. Dineinski uzrokovane oscilacije

Citoplazmatski dinein je molekularni motor, koji se giba usmjereno prema minus kraju mikrotubula, te ima značajnu ulogu u mnogim staničnim funkcijama. Dinein prenosi vezikule, organele i druge stanične terete sa stanične periferije do centra stanice (Vallee *et al.*, 2004) te pozicionira centrosome tijekom stanične interfaze (Burakov *et al.*, 2003; Palazzo *et al.*, 2001; Laan *et al.*, 2012; Pavin *et al.*, 2012). Tijekom mitoze, dinein povlači astralne mikrotubule kako bi pozicionirao diobenno vreteno (Eshel *et al.*, 1993; Gönczy *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1993; O'Connell and Wang, 2000; Skop and White, 1998). Također, dinein se veže na kinetohore gdje regulira vezivanje mikrotubula, napetost na kinetohorama, gibanje kromosoma i aktivaciju kontrolne točke diobenog vretena (Varma *et al.*, 2008; Wojcik *et al.*, 2001). U profazi mejoze dinein sudjeluje u gibanju kromosoma nužnom za sparivanje homolognih kromosomskih parova. (Yamamoto *et al.*, 1999)

Da bi mogao vući unutarstanične strukture, dinein pronalazi uporište na proteinima usidrenim na staničnom korteksu ili koristi silu trenja nastalu gibanjem organela kroz viskoznu citoplazmu (Kimura and Kimura, 2011). Poznato je da mnoštvo bioloških struktura i funkcija prisutnih u navedenim procesima, proizlazi iz svojstva samo-organizacije motornih proteina i citoskeletskih vlakana, no sam mehanizam samo-organizacije dineinskih motora ostaje nerazjašnjen.

Spontane oscilacije jezgre, diobenog vretena i kromosoma uočene su u mnogim eukariotskim organizmima (Li *et al.*, 1993; Bajer 1982; Chikashige *et al.*, 1994; Fink *et al.*, 2006; Rieder *et al.*, 1986). Ekperimentalno je potvrđeno da su ove oscilacije, pri kojima se unutarstanične strukture gibaju naprijed-nazad, uzrokovane djelovanjem mnoštva motora. Takve spontane oscilacije predstavljaju jednostavan primjer složenije dinamike i idealne su za proučavanje dinamičkih svojstava mnoštva motora i mikrotubula. Promatranje značajki oscilatornog ponašanja organela, poput nagle promjene njihovog usmjerenog gibanja te interakcije, istovjetno djelujućih, međusobno oprečnih sila omogućuje nam bolje razumijevanje mehanizma samo-organizacije motornih proteina.

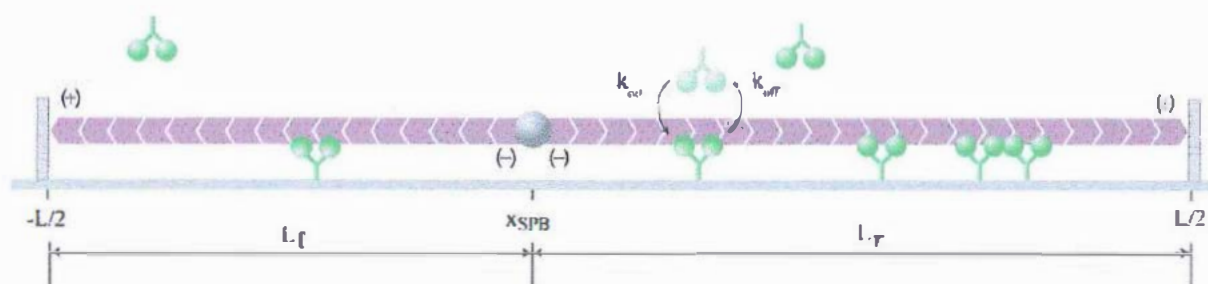
Kako bismo proučili na koji način molekularni motori generiraju pravilne oscilacije u stanici, u ovom radu, kao sistemski model, koristili smo oscilacije jezgre tijekom profaze mejoze u stanicama kvasca, gdje nam prisustvo malog broja mikrotubula omogućuje praćenje dinamike svih mikrotubula te broja dineina vezanih na pojedini mikrotubul. Ove oscilacije nužne su za sparivanje kromosoma, rekombinaciju genetskog materijala i održivost spora (Chikashige *et al.* 1994; Ding *et al.*, 2004). Tijekom oscilacija, jezgra slijedi mikrotubulni centar, SPB (spindle pole body), koji se pomiče naprijed-nazad, od jednog staničnog kraja do drugog. Mikrotubuli izviru iz SPB-a sa svojim minus krajem položenim na SPB, a plus krajem usmjerenim prema staničnoj periferiji. Prikupljeni eksperimentalni podaci ukazuju da dineinski motor, usidren na staničnom korteksu, povlači vodeći mikrotubul koji shodno tome povlači SPB. Nedavna istraživanja, vršena „*in vivo*“, (Vogel *et al.* 2009; Ananthanarayanan *et al.*, 2013), eksperimentalno su pokazala da otpuštanje motora s mikrotubula pod utjecajem sile opterećenja proizvodi dinamičku nestabilnost nužno potrebnu za jezgrine oscilacije. Difuzija omogućava dineinima gibanje citoplazmom te ciljanje mikrotubula na različitim pozicijama. Drugim riječima, kretanjem citoplazmom, dinein se repositionira kroz stanicu tvoreći samo-organizirane uzorke potrebne za generiranje jezgrinih oscilacija.

Teoretski opis motorno-ovisnih oscilacija diobenog vretena i kromosoma ustanovljen je u prijašnjim radovima (Campas and Sens, 2006; Civelekoglu-Scholey *et al.*, 2006; Grill *et al.*, 2005; Joglekar and Hunt, 2002; Kozlowski *et al.*, 2007; Pecreaux *et al.*, 2006). Teorijski modeli oslanjaju se na otpuštanje motornih proteina s mikrotubula pod utjecajem sile opterećenja koja djeluje na njih, što je u skladu s provedenim „*in vitro*“ istraživanjem (Coppin *et al.*, 1997). Za vrijeme oscilacija, dinein se otpušta sa staničnog korteksa pod utjecajem visoke sile opterećenja koja je prisutna na „pratećim“ mikrotubulima koji slijede SPB. Istovremeno, dineini se nakupljaju na „vodećim“ mikrotubulima koji prethode jezgri, gdje je sila opterećenja niža. Na taj način tijekom jezgrinih oscilacija vezat će se više dineina na mikrotubule koji se nalaze ispred jezgre nego na one koji se nalaze iza nje, čak i u trenutku prolaska jezgre kroz stanični centar, kada je duljina mikrotubula jednaka (Vogel *et al.*, 2009; Tolic-Norrelykke, 2010).

U sljedećim poglavljima prikazat ćemo model oscilacija jezgre u aproksimaciji srednjeg polja te potom uvesti novi stohastički model koji će odgovoriti na pitanje utjecaja fluktuacija broja dineinskih motora na pravilnost periodičkih oscilacija.

1.2. Aproximacija srednjeg polja

Kao početnu točku našeg istraživanja iskoristili smo jednodimenzionalni model oscilacija jezgre u profazi mejoze *Schizosaccharomyces pombe* dan u (Vogel *et al.*, 2009). U razmatranje uzimamo motore vezane na mikrotubul te njihovo vezivanje na stanični korteks.



Slika 1. Jednodimenzionalni model oscilacija jezgre. Mikrotubuli (ljubičasta) izlaze iz SPB-a (tamno siva kugla), na poziciji x_{SPB} , te se pružaju prema rubu stanice. Duljina desnog mikrotubula označena je s L_r , duljina lijevog mikrotubula označena je s L_l , a duljina stanice s L . Dineinski motori (zeleni piktogrami) vežu se na mikrotubule sa stopom pričvršćivanja k_{on} i otpuštaju sa stopom otpuštanja k_{off} . Dineinski motori hodaju prema minus kraju mikrotubula.

U ovom modelu dva mikrotubula pružaju se iz SPB-a prema suprotnim krajevima stanice (Slika 1). Mikrotubul se može nalaziti u jednom od dva stanja: rast ili skraćivanje, ovisno o poziciji SPB-a i odnosu sila na lijevom i desnom mikrotubulu. Ravnoteža sila dana je sljedećom relacijom:

$$\xi \frac{dx_{SPB}}{dt} = F_l + F_r \quad (1)$$

gdje je x_{SPB} pozicija SPB-a s obzirom na os položenu po dužini stanice, ξ koeficijent trenja sustava jezgre, SPB-a i mikrotubula, a sile F_l i F_r ukupne sile svih motora vezanih na lijevi, odnosno desni mikrotubul. Zbog viskoznosti stanične tekućine, sustav se nalazi u dinamičkoj ravnoteži te su sile otpora fluida uravnotežene s ukupnim silama motora te je kao posljedica akceleracija sustava jednaka nuli.

Ukupna sila svih motora koji djeluju na lijevi, odnosno desni mikrotubul jednaka je zbroju svih sila pojedinačnih motora vezanih na lijevi, odnosno desni mikrotubul:

$$F_l = N_l f_l \quad (2)$$

$$F_r = N_r f_r \quad (3)$$

gdje je N_l , odnosno N_r ukupan broj motora pričvršćenih na lijevi, odnosno desni mikrotubul, dok je f_l , odnosno f_r sila uzrokovana jednim takvim motorom s lijeve, odnosno desne strane SPB-a. Sile f_l i f_r dane su linearnom vezom između sile i brzine.

$$v = v_0 \left(1 + \frac{f_l}{f_0} \right) \quad (4)$$

$$v = v_0 \left(-1 + \frac{f_r}{f_0} \right) \quad (5)$$

gdje je v_0 brzina motora na kojeg ne djeluje sila, a f_0 sila kojom je potrebno djelovati na motor da se on zaustavi. Brzina motora spiam mikrotubula danaje s:

$$v = -v_{SPB} = -\frac{dx_{SPB}}{dt} \quad (6)$$

gdje je v_{SPB} brzina SPB-a. Duljina lijevog mikrotubula označena je s L_l , a duljina desnog mikrotubula s L_r . U modelu aproksimacije srednjeg polja pretpostavljamo da su motori uniformno raspoređeni kako u citoplazmi, tako i na mikrotubulima. Stoga uvodimo linearnu gustoću motora na lijevoj, odnosno desnoj strani koje su dane s $n_l = \frac{N_l}{L_l}$, odnosno $n_r = \frac{N_r}{L_r}$.

Vremenska promjena gustoće motora na desnom mikrotubulu dana je dinamičkom jednadžbom koja opisuju vezivanje i otpuštanje motora s desnog mikrotubula.

$$\frac{dn_r}{dt} = k_{on}c - k_{off}(f_r)n_r \quad (7)$$

gdje je c citoplazmatska koncentracija motora, k_{on} stopa vezivanja motora na mikrotubul, a k_{off} stopa otpuštanja motora s mikrotubula. Stopa vezivanja ovisi o duljini mikrotubula i koncentraciji motora prisutnih u citoplazmi. Stopa otpuštanja ovisi isključivo o sili opterećenja koja djeluje na dineinske motore i dana je sljedećom relacijom:

$$k_{off}(f_r) = k_0 e^{\frac{f_r}{f_c}} \quad (8)$$

Ovdje je f_r sila opterećenja koja djeluje na pojedini motor, k_0 stopa otpuštanja motora na kojeg ne djeluje sila opterećenja, a f_c karakteristična sila ovisnosti stope otpuštanja o sili opterećenja.

Dinamičku jednadžbu za motore na lijevoj strani dobivamo zamjenom indeksa r indeksom l te promjenom predznaka sile opterećenja **Eq. (8)**.

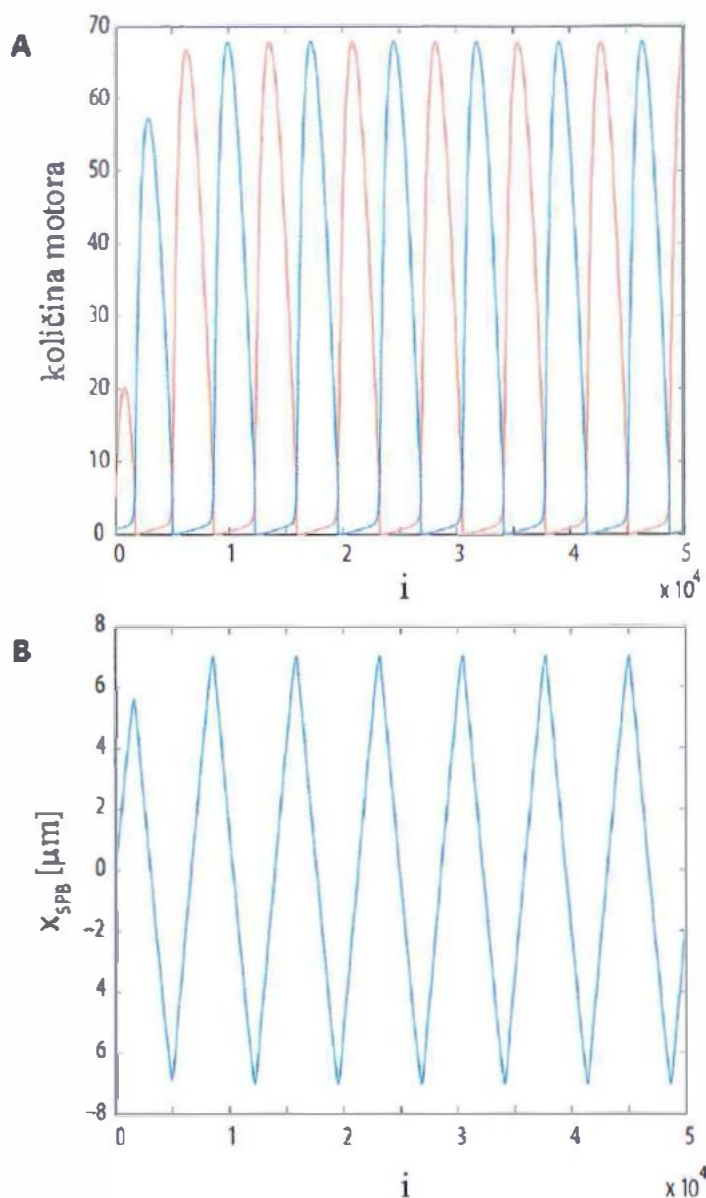
$$\frac{dn_l}{dt} = k_{on}c - k_{off}(f_l)n_l \quad (9)$$

$$k_{off}(f_l) = k_0 e^{\frac{f_l}{f_c}} \quad (10)$$

Numeričkim rješavanjem dinamičkih jednadžbi modela u aproksimaciji srednjeg polja, s parametrima danim u **Tablici 1**, dobivamo periodičke oscilacije gustoće motora (**Slika 2A**) te oscilatorno gibanje SPB-a (**Slika 2B**) koje je opisano gotovo trokutastom funkcijom čija je amplituda tek nešto manja od $L/2$, gdje je L duljina promatrane stanice.

Parametar	Naziv	Vrijednost	Izvor
L	Duljina stanice	$14 \mu\text{m}$	Vogel <i>et al.</i> , 2009
v_0	Brzina motora bez djelovanja sile	$2.5 \mu\text{m}/\text{min}$	Vogel <i>et al.</i> , 2009
f_0	Zaustavna sila	7 pN	Toba <i>et al.</i> , 2006 Gennerich <i>et al.</i> , 2007
$k_{on}c$	Stopa vezivanja	$0.1 \mu\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$	Vogel <i>et al.</i> , 2009
k_0	Stopa otpuštanja bez djelovanja sile	0.01 s^{-1}	Vogel <i>et al.</i> , 2009
f_c	Karakteristična sila	2 pN	Vogel <i>et al.</i> , 2009
ξ	Koeficijent trenja	$100 \text{ pN s } \mu\text{m}^{-1}$	Tolic-Norrelykke <i>et al.</i> , 2004

Tablica 1. Parametarske vrijednosti korištene u simulaciji aproksimacije srednjeg polja



Slika 2. Prikaz događaja tijekom oscilacija. (A) Dijagram izmjene gustoće vezanih motora na lijevom (plava linija), odnosno desnom (crvena linija) mikrotubulu. **(B)** Pozicija SPB-a na osi postavljenoj uzduž stanice, x_{SPB} . Simulacija je izvedena sa sljedećim početnim uvjetima $n_r = 5 \mu m^{-1}$, $n_l = 0 \mu m^{-1}$, $x_{SPB} = 0 \mu m$. Dva mikrotubula se pružaju iz SPB-a prema suprotnim krajevima stanice. U početnom trenutku više je motora vezano na desni mikrotubul, stoga se SPB giba na desno. Kako se SPB giba, tako su motori na lijevoj strani pod sve većim opterećenjem što uzrokuje njihovo otpuštanje. Sila opterećenja na motore na desnoj strani je mala. Zbog konačne duljine stanice desni mikrotubul se skraćuje te gubi motore. U jednom trenutku, broj motora na lijevoj i desnoj strani postaje jednak i SPB se ne kreće. S obzirom na to da je lijevi MT sada dulji od desnog, na njega se vezuje više motora. Stoga, SPB mijenja smjer i oscilacijski ciklus se nastavlja.

1.3. *Obrazloženje teme*

Budući da su dineinski motori prisutni u svim eukariotskim organizmima, uključujući i ljude, bolje razumijevanje načina njihovog funkcioniranja za nas je vrlo značajno. Model iz prethodnog poglavlja koji opisuje oscilacije jezgre u profazi mejoze, nužne za pravilno sparivanje kromosoma i izmjenu genetskog materijala, citoplazmu tretira kao neograničen izvor dineinskih motora, te zanemaruje stohastičke efekte.

U stvarnim sustavima broj dineinskih motora je ograničen, a utjecaj stohastike na promatrani sustav nije moguće zanemariti. Cilj ovog rada je ustanoviti granice primjenjivosti modela u aproksimaciji srednjeg polja s obzirom na ograničeni citoplazmatski rezervoar te ispitati značaj ukupnog broja dineinskih motora prisutnih u stanici. Uz pomoć stohastičkih simulacija odredit ćemo optimalan broj dineina potreban za postizanje pravilnih periodičnih oscilacija SPB-a te ih usporediti s eksperimentalnim opažanjima prikazanim u radu (Ananthanarayanan *et al.*, 2013).

Uz pomoć stohastičkih simulacija ispitat ćemo utjecaj trenja sustava citoplazme, mikrotubula, motora i jezre na pravilnost oscilacija. Ispitat ćemo i parametarski prostor navedenog modela varirajući vrijednosti stope priključivanja k_{on} te konstante otpuštanja motora sa mikrotubula k_0 .

Promatrajući pravilnost oscilatornog ponašanja jezgre predložit ćemo granične vrijednosti pojedinih parametara u okviru stohastike.

Metode

2.1. Stokastički model

Matematički opis vremenskog ponašanja prostorno homogenog procesa moguće je izvršiti na dva načina: determinističkim pristupom, smatrajući vremensku evoluciju kontinuiranom te opisujući promatrani sustav setom više diferencijalnih jednadžbi ili stohastičkim pristupom, promatrajući vremensku evoluciju sustava u okvirima procesa nasumičnog hoda te opisujući ju jednom diferencijalnom jednadžbom „master“ jednadžbom.

Pri razradi stohastičkog modela oscilacija jezgre u stanicama kvasca, radi pojednostavljenja, uvodimo sljedeće aproksimacije:

1. Dineinski motori, prisutni u citoplazmi, u svakom trenutku su homogeno raspoređeni u citoplazmi te je vjerojatnost njihovog vezivanja na jedan od mikrotubula, u idućem trenutku, neovisna o njihovoj prijašnjoj poziciji.
2. Eksperimentalno opažena skupina mikrotubula s lijeve, odnosno desne strane jezgre, predstavljena je s po jednim mikrotubulom s lijeve, odnosno desne strane jezgre.
3. Lijevi i desni mikrotubul, u svakom trenutku, dodiruju rub stanice (**Slika 1**) te je zbroj njihovih duljina jednak duljini stanice

$$L_l(t) + L_r(t) = L$$

4. Razlikujemo samo dvije populacije dineinskih motora, slobodne motore, prisutne u citoplazmi te motore koji povezuju mikrotubul sa staničnim korteksom. Zanimljivo je postojanje populacije dineinskih motora vezanih isključivo na mikrotubule i populacije dineinskih motora vezanih isključivo na stanični korteks. Na ovaj način pretpostavljamo da se vezanje dineina iz citoplazme na mikrotubul i stanični korteks odvija u jednom koraku. Eksperimentalno je utvrđeno (Ananthanarayanan *et al.*, 2009) da se proces vezanja i otpuštanja odvija u dva koraka, dinein se prvo veže na mikrotubul pa potom na

stanični korteks, ali je brzina drugog koraka znatno veća od brzine prvog koraka pa je jednokoračna aproksimacija opravdana.

5. Ukupan broj dineinskih motora u stanici smatramo stalnim za vrijeme trajanja jedne stohastičke simulacije.
6. Proteinska uporišta, nužna za vezivanje dineinskih motora, homogeno su raspoređena po staničnom korteksu

2.2. „Master” jednadžba

„Master” jednadžbe su diferencijalne jednadžbe koje opisuju vjerojatnost događaja Markovljevih procesa pri prijelazu promatranog sistema iz jednog stanja u drugo u kontinuiranom vremenu. Za diskretan broj dostupnih stanja prijelaza sistema, ovakve jednadžbe pružaju dobar opis mnogih procesa, poput širenja epidemija, radioaktivnih procesa te kemijskih i bioloških reakcija (Toral *et al.*, 2014).

Promjena količine dineinskih motora na mikrotubulima odgovorna je za oscilacije SPB-a, tako da sustav koji opisuje „master” jednadžba čine lijevi i desni mikrotubul te dineinski motori koji se ili vezuju ili otpuštaju s mikrotubula.

Promatrat ćemo vremensku promjenu vjerojatnosti da sustav u trenutku t ima N_l motora na lijevom i N_r motora na desnom mikrotubulu. Razmatrajući sve moguće ishode ovakvog sustava postavili smo sljedeću jednadžbu:

$$\begin{aligned} \frac{dP(N_l, N_r, t)}{dt} = & P(N_l, N_r, t)[-A(L_l) - C(N_l, N_r) - B(L_r) - D(N_l, N_r)] + \\ & + P(N_l, N_r, t)[-C(N_l, N_r)B(L_r) - C(N_l, N_r)D(N_l, N_r) - A(L_l)B(L_r) - A(L_l)D(N_l, N_r)] + \\ & + P(N_l - 1, N_r, t)A(L_l) + \\ & + P(N_l, N_r - 1, t)B(L_r) + \\ & + P(N_l + 1, N_r, t)C(N_l + 1, N_r) + \\ & + P(N_l, N_r + 1, t)D(N_l, N_r + 1) + \\ & + P(N_l - 1, N_r + 1, t)A(L_l)D(N_l - 1, N_r + 1) + \\ & + P(N_l + 1, N_r - 1, t)B(L_r)C(N_l + 1, N_r - 1) + \\ & + P(N_l - 1, N_r - 1, t)A(L_l)B(L_r) \\ & + P(N_l + 1, N_r + 1, t)C(N_l + 1, N_r + 1)D(N_l + 1, N_r + 1) \end{aligned} \quad (11)$$

gdje je N_l broj dineinskih motora na lijevom mikrotubulu, N_r broj dineinskih motora na desnom mikrotubulu, L_l duljina lijevog mikrotubula, L_r duljina desnog mikrotubula u promatranom trenutku t .

Pokrate A, B, C, D dane su na sljedeći način:

$$A(L_l) = k_{on}cL_l \quad (12)$$

Član $A(L_l)$ predstavlja događaj vezivanja jednog dineinskog motora na lijevi mikrotubul.

$$B(L_r) = k_{on} c L_r \quad (13)$$

Član $B(L_r)$ predstavlja događaj vezivanja jednog dineinskog motora na desni mikrotubul.

$$C(N_l, N_r) = k_{off} N_l \quad (14)$$

Član $C(N_l, N_r)$ predstavlja otpuštanje jednog dineinskog motora s lijevog mikrotubula u citoplazmu.

$$D(N_l, N_r) = k_{off} N_r \quad (15)$$

Član $D(N_l, N_r)$ predstavlja otpuštanje jednog dineinskog motora s desnog mikrotubula u citoplazmu.

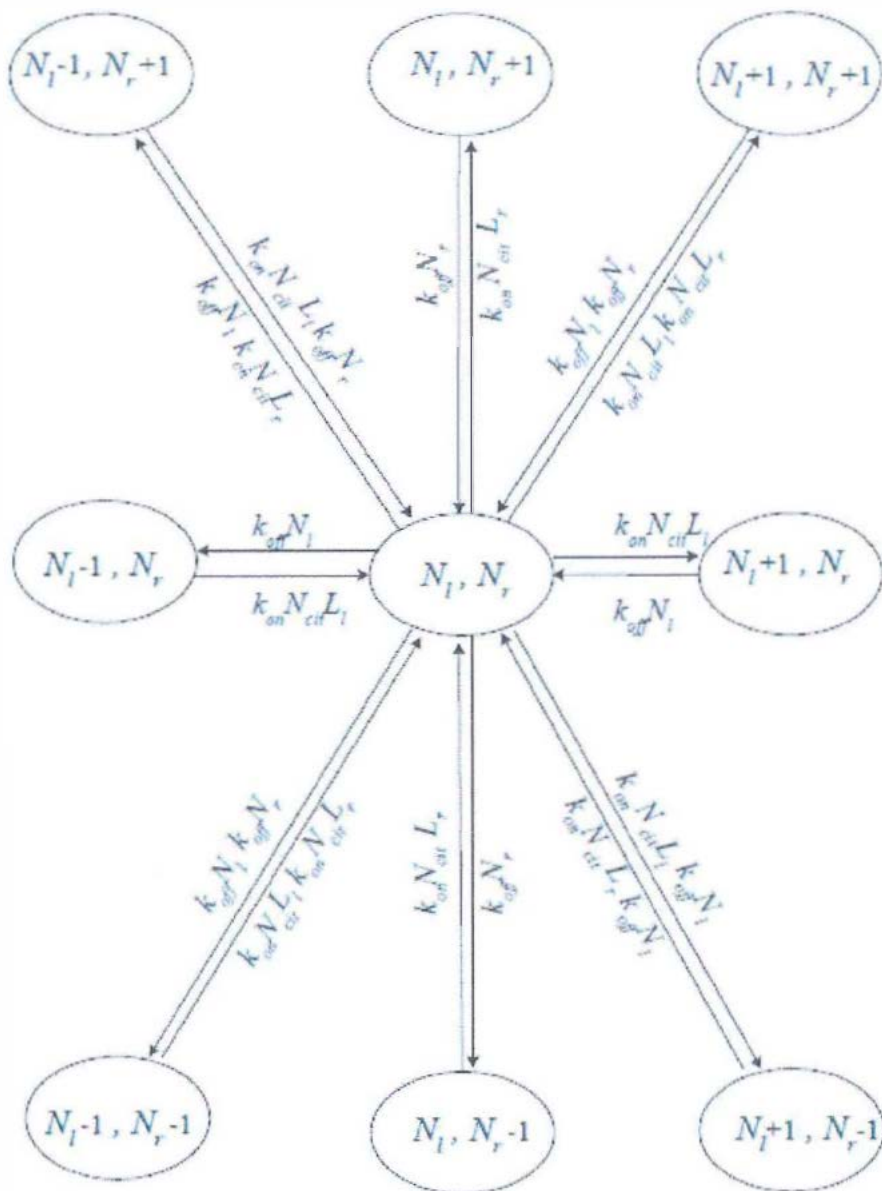
Stopa otpuštanja dineinskih motora u citoplazmu zadana je na slijedeći način:

$$k_{off} = k_0 e^{\frac{f_0}{f_c} \left(\frac{\mu + 2N_l}{\mu + N_r + N_l} \right)} \quad (16)$$

gdje je k_0 stopa otpuštanja dineinskih motora s mikrotubula u citoplazmu bez djelovanja vanjske sile, f_c karakteristična sila citoplazme.

Članovi jednadžbe Eq. (11) predstavljaju redom: vjerojatnost zadržavanja sistema u stanju gdje se na lijevom MT nalazi N_l , a na desnom MT N_r motora, vjerojatnost da se u stanje s $N_l - 1, N_r$ motora na mikrotubulima veže jedan motor na lijevi MT, vjerojatnost da se u stanje s $N_l, N_r - 1$ motora na mikrotubulima veže jedan motor na desni MT, vjerojatnost da se u stanje s $N_l + 1, N_r$ motora na mikrotubulima otpusti jedan motor s lijevog MT, vjerojatnost da se u stanje s $N_l, N_r + 1$ motora na mikrotubulima otpusti jedan motor s desnog MT, vjerojatnost da se u stanje s $N_l - 1, N_r + 1$ motora na mikrotubulima istovremeno veže jedan motor na lijevi MT i otpusti jedan motor s desnog MT, vjerojatnost da se u stanje s $N_l + 1, N_r - 1$ motora na mikrotubulima istovremeno otpusti jedan motor s lijevog MT i veže jedan motor na desni MT, vjerojatnost da se u stanja s $N_l - 1, N_r - 1$ motora na mikrotubulima istovremeno veže po jedan motor na oba MT te vjerojatnost da se u stanja s $N_l + 1, N_r + 1$ motora na mikrotubulima istovremeno otpusti po jedan motor s oba MT.

Shematski prikaz jednadžbe Eq. (11) dan je na Slici 3 te omogućava lakše razumijevanje opisanog stohastičkog procesa.

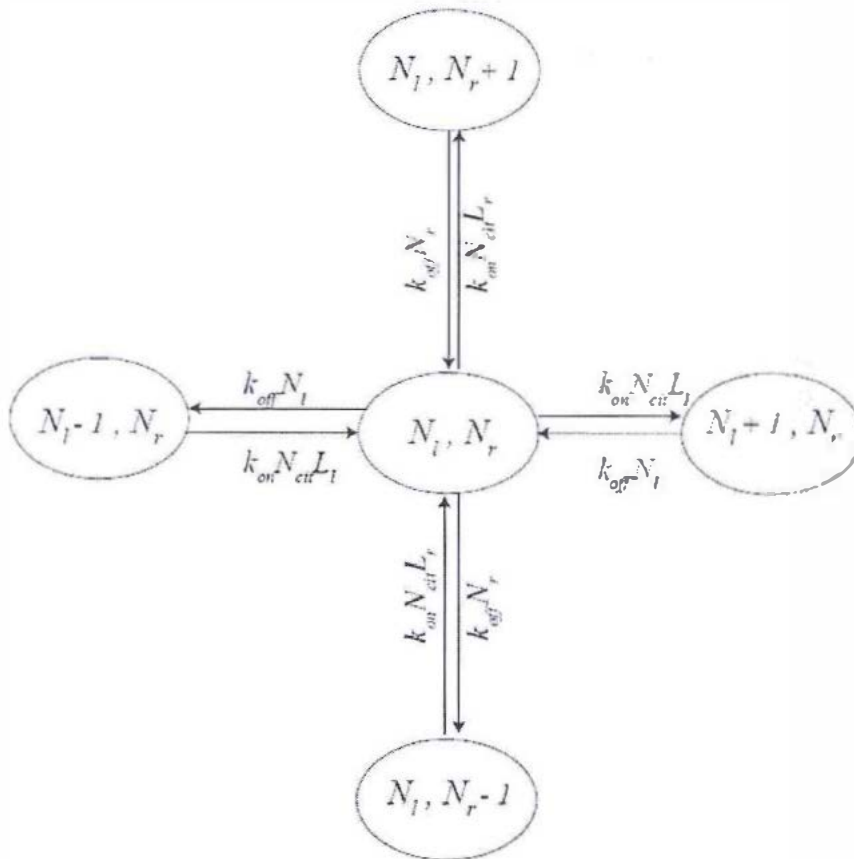


Slika 3. Shematski prikaz „master” jednačbe. Eq. (11). Moguća stanja sustava su zaokružena, a prijelazi među njima naznačeni su odgovarajućim koeficijentima na spojnim osima.

U sljedećem koraku uvodimo aproksimaciju u kojoj nije moguće ostvarivanje više istovremenih događaja na oba mikrotubula. U ovoj aproksimaciji općenita „master” jednačba Eq. (16) ostaje bez dijagonalnih članova i svodi se na sljedeći, pojednostavljeni oblik:

$$\begin{aligned}
 \frac{dP(N_l, N_r, t)}{dt} = & P(N_l, N_r, t)[-A(L_l) - C(N_l, N_r) - B(L_r) - D(N_l, N_r)] + \\
 & + P(N_l, N_r, t)[-C(N_l, N_r)B(L_r) - C(N_l, N_r)D(N_l, N_r) - A(L_l)B(L_r) - A(L_l)D(N_l, N_r)] + \\
 & + P(N_l - 1, N_r, t)A(L_l) + \\
 & + P(N_l, N_r - 1, t)B(L_r) + \\
 & + P(N_l + 1, N_r, t)C(N_l + 1, N_r) + \\
 & + P(N_l, N_r + 1, t)D(N_l, N_r + 1)
 \end{aligned}
 \tag{17}$$

Shematski prikaz jednadžbe Eq. (17) dan je na Slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz pojednostavljene „master” jednadžbe u kojoj je vjerojatnost ostvarivanja istovremenih događaja zanemarena.

Koeficijenti prijelaza između susjednih stanja u jednadžbi Eq. (17) nelinearno su ovisni o broju motora, čija se vrijednost mijenja u vremenu, te stoga „master” jednadžbu nije moguće riješiti analitički. Pri daljnjem razmatanju prelazimo na numeričko rješavanje „master” jednadžbe koristeći Gillespie algoritam.

2.3. Gillespie algoritam

Stohastička „master“ jednačba često je analitički nerješiva te je stoga osmišljen relativno jednostavan način pronalaženja numeričkih rješenja vremenskog razvoja promatranog procesa unutar okvira stohastičke formulacije.

Gillespie algoritam je računalni algoritam koji koristi Monte Carlo proceduru kako bi generirao vremena promatranih događaja te valjano predvidio bitne fluktuacije i korelacije koje su kod determinističke formulacije zanemarene (Gillespie *et al.*, 1977).

U ovoj aproksimaciji ograničit ćemo se samo na „one-step“ procese. Promatrani proces je Markovljev proces čiji se rang sastoji od količine dineinskih motora na lijevoj i desnoj strani mikrotubula N_l i N_r , te čiji prijelazi dozvoljavaju samo skokove između susjednih stanja.

Ovakav proces poštuje Markovljevo svojstvo koje opisuje činjenicu da razdioba vjerojatnosti slučajne varijable x_t u trenutku $t = t_n$ ovisi samo o vrijednosti x_{n-1} procesa u trenutku t_{n-1} , a ne ovisi o vrijednostima procesa u ranijim momentima (Winston 2004).

Modificirani Gillespie algoritam primijenjen na naš stohastički model možemo predložiti na sljedeći način:

Korak 1. Nasumični brojevi, u i r , generirani su iz uniformne distribucije na intervalu $(0,1]$.

Korak 2. Vrijednosti koeficijenata prijelaza Eq. (12) - (15) pojednostavljene „master“ jednačbe Eq. (17) izračunate su u trenutku t :

$$A(L_l) = k_{on} N_{cit} L_l$$

$$B(L_r) = k_{on} N_{cit} L_r$$

$$C(N_l, N_r) = k_{off} N_l$$

$$D(N_l, N_r) = k_{off} N_r$$

$$\alpha_0 = A + B + C + D$$

Korak 3. Uz pomoć broja u određeno je vrijeme koje protekne do realizacije slijedećeg događaja koristeći izraz:

$$\tau = \frac{1}{\alpha_0} \left\lceil \frac{1}{u} \right\rceil$$

Korak 4. Na sljedeći način, pomoću broja r , određen je događaj koji će se realizirati:

$$\text{Ako } 0 < r \leq A \text{ onda} \quad \begin{cases} N_l(t + \tau) = N_l(t) + 1 \\ N_r(t + \tau) = N_r(t) \end{cases}$$

$$\text{Ako } A < r \leq A + B \text{ onda} \quad \begin{cases} N_l(t + \tau) = N_l(t) \\ N_r(t + \tau) = N_r(t) + 1 \end{cases}$$

$$\text{Ako } A + B < r \leq A + B + C \text{ onda} \quad \begin{cases} N_l(t + \tau) = N_l(t) - 1 \\ N_r(t + \tau) = N_r(t) \end{cases}$$

$$\text{Ako } A + B + C < r \leq A + B + C + D \text{ onda} \quad \begin{cases} N_l(t + \tau) = N_l(t) \\ N_r(t + \tau) = N_r(t) - 1 \end{cases}$$

Sukladno tome koji se događaj ostvari, izmjenjuju se vrijednosti varijabli N_l , N_r , L_l , L_r . Trenutno vrijeme t , povećava se za iznos τ : $t(i+1) = t(i) + \tau(i)$ te se algoritam vraća na Korak 1. Postupak se ponavlja sve dok vrijednost t ne dosegne zadanu maksimalnu vrijednost.

Rezultati i rasprava

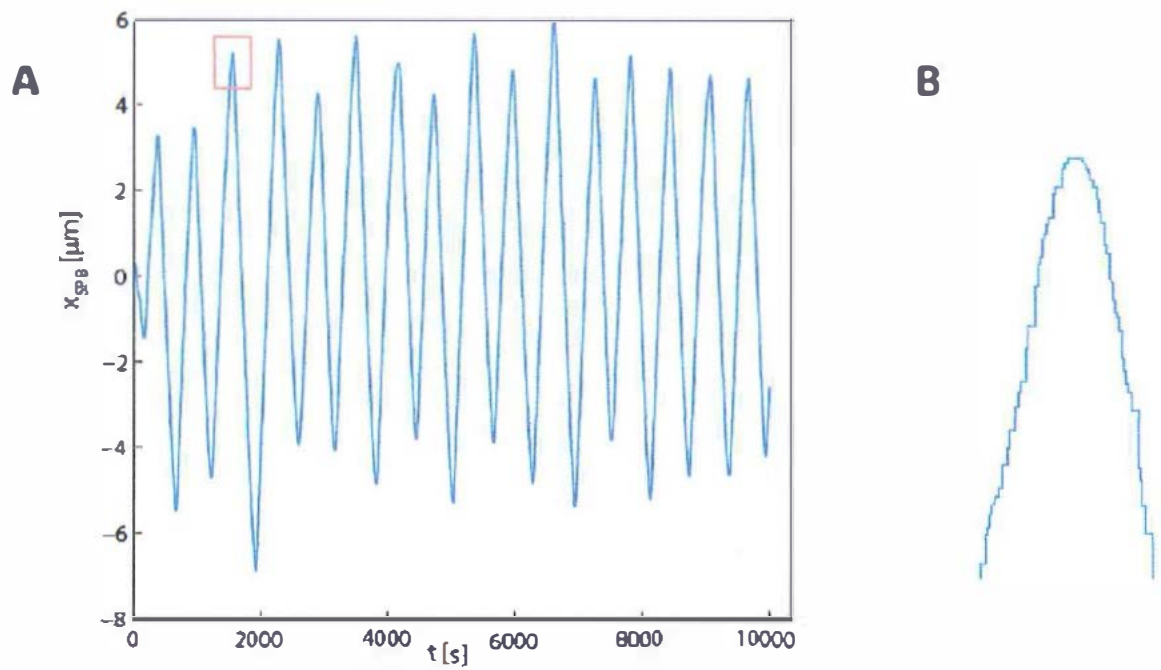
3.1. Neograničeni rezervoar

Postavili smo model koji u obzir uzima stohastičke efekte sustava mikrotubula i dineinskih motora. Za razliku od modela aproksimacije srednjeg polja, broj dineinskih motora više nije dan kontinuiranom, već diskretnom raspodjelom te je njegova vrijednost u svakom trenutku cjelobrojna.

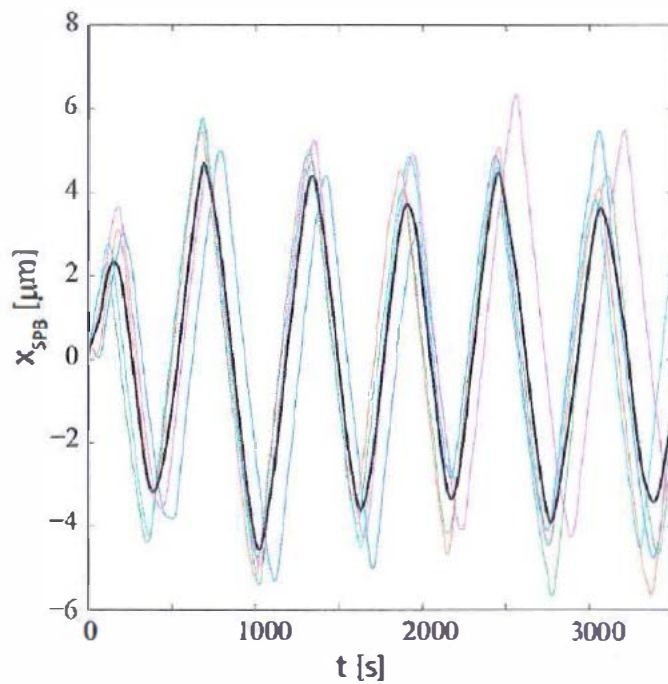
U svakom od danih trenutaka ostvaruje se samo po jedan od sljedećih događaja: vezivanje motora na lijevi MT, otpuštanje motora s lijevog MT, vezivanje motora na desni MT ili otpuštanje motora s desnog MT.

U prvoj inačici stohastičkog modela pretpostavit ćemo da je količina motora u citoplazmi neograničena (neograničeni rezervoar). Zbog toga ćemo pretpostaviti da je umnožak stope vezivanja k_{on} , i citoplazmatske koncentracije motora c , neovisan o vremenu.

Na Slici 5 prikazana je vremenska evolucija jedne stohastičke simulacije promatranog „mikrotubul-dinein“ sustava, gdje je svaki sljedeći događaj određen pomoću Gillespie algoritma. Pri provjeravanju podudarnosti stohastičnog modela i modela aproksimacije srednjeg polja, napravili smo više stohastičkih simulacija te odredili njihovu krivulju usrednjenja (Slika 6). Budući da krivulja usrednjenja opisuje pravilne i periodične oscilacije stohastički model pruža dobru podudarnost s modelom aproksimacije srednjeg polja. U sljedećem koraku modificiramo naš model uvodeći ograničen citoplazmatski rezervoar.



Slika 5. (A) Stohastička simulacija pomaka SPB-a u vremenu, $t = 10000$ s. (B) Uvećani prikaz dijela oscilatorne trajektorije s jasno vidljivim skokovitim prijelazima između dva stanja sistema.



Slika 6. Više stohastičkih simulacija pomaka SPB-a. Izveli smo 5 stohastičkih simulacija, na dijagramu prikazanih drugačijim bojama. Crna krivulja predstavlja srednju vrijednost pomaka SPB-a u svakom od trenutaka

3.2. Ograničeni rezervoar

Budući da u stvarnim biološkim modelima broj dineinskih motora nije beskonačan, za bolje opisivanje sustava potrebno prijeći na model ograničenog rezervoara. Umjesto ulaznog parametra k_{onc} , uvodimo $k_{on}N_{cit}$, gdje je k_{on} stopa vezivanja pojedinog motora na mikrotubul, a N_{cit} broj citoplazmatskih motora dostupnih za vezivanje.

N_{cit} je vremenski promjenjiva varijabla pa vjerojatnost vezivanja motora na mikrotubul više ne ovisi isključivo o duljini mikrotubula, nego i o količini dostupnih motora u citoplazmatskom rezervoaru.

U svakom trenutku t broj motora u citoplazmi zadan je na sljedeći način:

$$N_{cit}(t) = N_{uk} - N_l(t) - N_r(t) \quad (18)$$

gdje je N_{uk} ukupan, vremenski neovisan, broj dineinskih motora prisutan u stanici, N_l broj motora vezanih na lijevi mikrotubul te N_r broj motora vezanih na desni mikrotubul, u trenutku t . Ostali parametri koje koristimo pri izvođenju stohastičkih simulacija dani su u **Tablici 1**.

Prvo smo razmatrali stohastičku simulaciju gibanja SPB-a s citoplazmatskim rezervoarom koji sadrži veliki ukupni broj motora, $N_{uk} = 100$ (Slika 7A). Kako bismo provjerili periodičnost dobivene oscilatorne funkcije izračunali smo vremensku autokorelacijsku funkciju definiranu izrazom:

$$R_{xx} = \frac{1}{T} \int_0^T x(t)x(t + \tau)dt \quad (19)$$

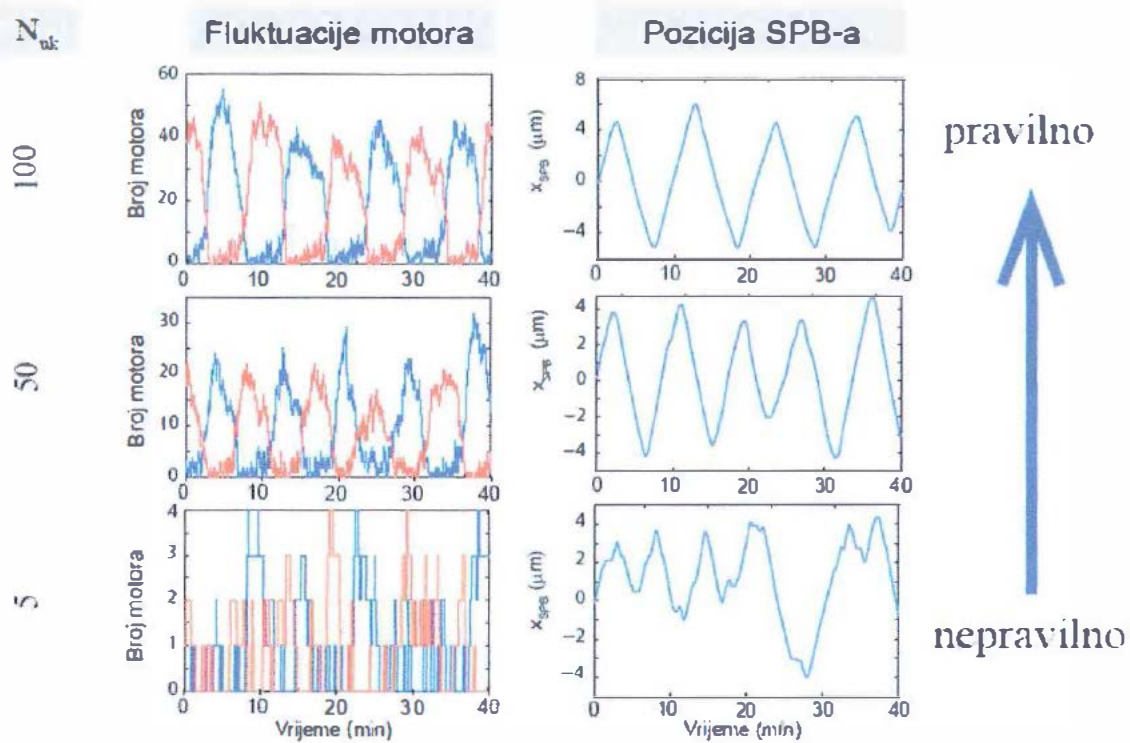
U prikazu autokorelacijske funkcije njezin središnji vrh predstavlja preklap funkcije same sa sobom bez pomaka u fazi, ($\tau = 0$) te je njegova vrijednost normirana na jedinicu. O periodičnosti oscilatornog gibanja SPB-a zaključujemo iz visine prvog sljedećeg vrha ($\tau =$ period oscilacije), gdje je kriterij vrednovanja periodičnosti dan u **Tablici 2**.

Autokorelacijski koeficijent R_{xx}	Periodičnost funkcije
$0.7 \leq R_{xx} < 1$	Vrlo dobra
$0.3 \leq R_{xx} < 0.7$	Dobra
$0 \leq R_{xx} < 0.3$	Nema

Tablica 2. Kriterij vrednovanja koeficijenta periodičnosti R_{xx} .

U sljedećem koraku razmatrali smo utjecaj daljnjeg smanjivanja ukupnog broja motora u citoplazmatskom rezervoaru na pravilnost oscilacija SPB-a za $N_{uk} = 50$ i $N_{uk} = 5$.

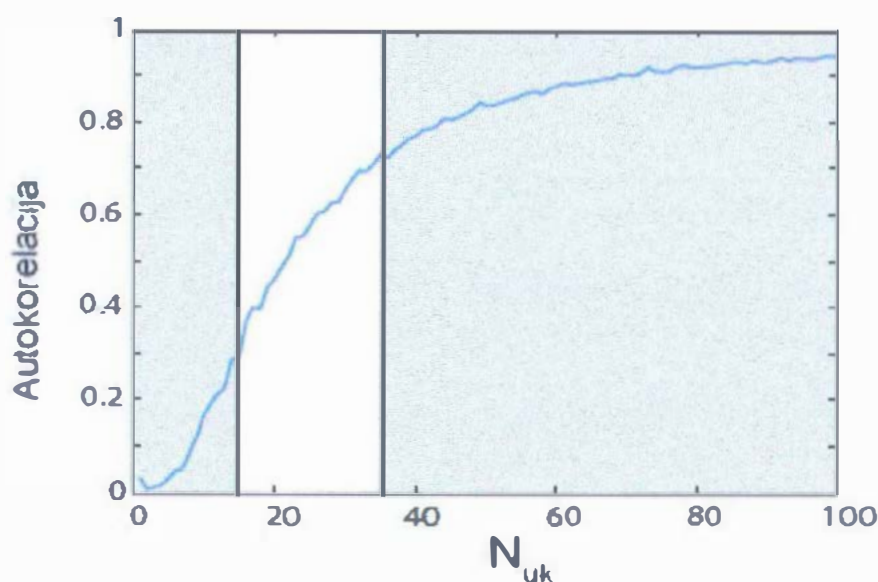
Oscilacije SPB-a s ograničenim rezervoarom pri velikom ukupnom broju motora, $N_{uk} = 100$, su pravilne (**Slika 7**, gore desno), kako se broj motora smanjuje, $N_{uk} = 50$ periodičnost oscilacija manje je umjerena (**Slika 7**, sredina desno), dok pri malom broju motora, $N_{uk} = 5$, periodičnost izostaje, (**Slika 7**, dolje desno).



Slika 7. Izmjena motora (lijevo) i oscilacije jezgre (desno) za različit ukupan broj dineinskih motora prisutnih u stanici. Vrlo pravilne oscilacije jezgre sa 100 motora u stanici (gore), pravilne oscilacije jezgre sa 50 motora u stanici (sredina) te nepravilne oscilacije jezgre sa 5 motora u stanici (dolje).

3.3. Periodičnost oscilacija s obzirom na ukupan broj motora

Kako bismo detaljno analizirali ovisnost periodičnosti oscilacija SPB-a o ukupnom broju motora varirali smo vrijednost N_{uk} , od $N_{uk} = 100$ do rezervoara koji sadrži samo jedan motor. Rezultati su predloženi dijagramom ovisnosti normalizirane visine drugog vrha autokorelacijske funkcije o ukupnom broju motora danom na **Slici 8**.



Slika 8. Ovisnost normalizirane visine drugog vrha autokorelacijske funkcije o ukupnom broju motora.

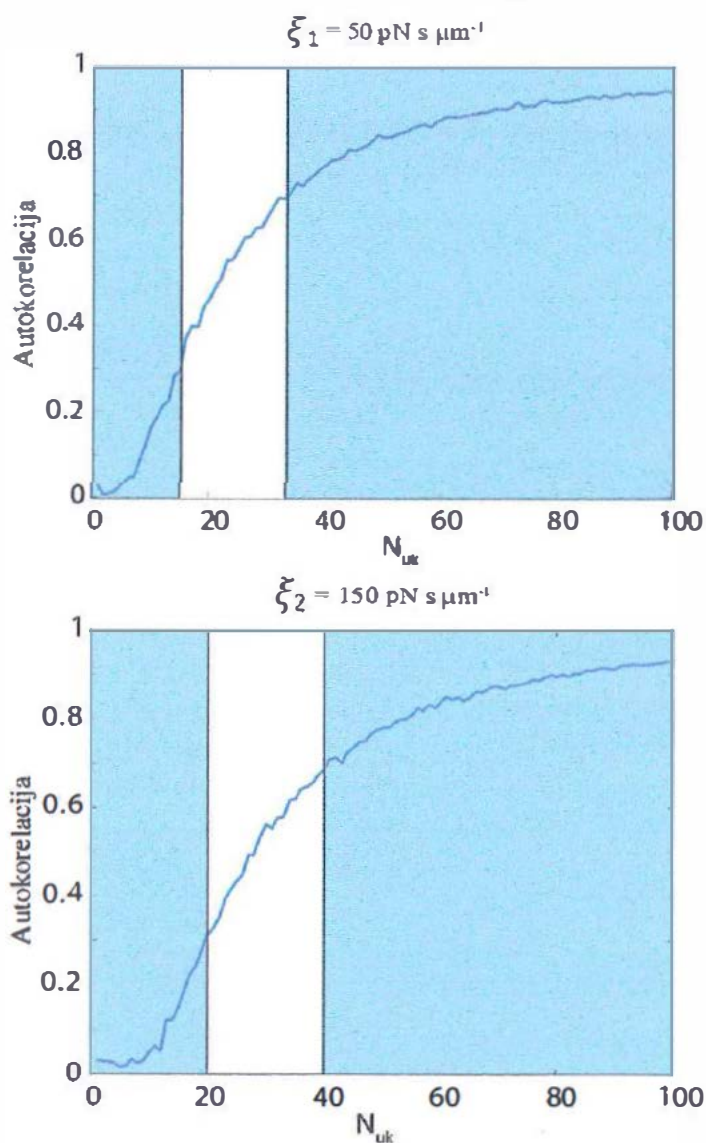
U prvom dijelu dijagrama, normirane visine drugog vrha autokorelacijske funkcije manje su od kritične vrijednosti koja ukazuje na periodičnost oscilacija jezgre te sporo rastu s povećanjem broja motora. Nakon kritične vrijednosti ostvarene na $N_{uk} = 18$ periodičnost oscilacija jezgre naglo raste s porastom broja motora te, prema kriteriju vrednovanja danom u **Tablici 2**, ulazi u područje periodičnosti dostatne za pravilno sparivanje kromosoma, izmjenu genetskog materijala i održivost spora (na dijagramu prikazano bijelim područjem). Na rubu tog područja, $N_{uk} = 38$, oscilacije postaju izrazito periodične te se nakon toga dana periodičnost sporo povećava s povećanjem broja motora. Iako je periodičnost ovakvih oscilacija veća od onih u drugom području, proizvodnja tolikog broja motora značila bi

preveliku potrošnju staničnih resursa te nije optimalna za razvoj stanice. Možemo zaključiti da je pri velikom broju motora razlika između ograničenog i neograničenog rezervoara očekivano zanemariva te za $N_{uk} > 60$ aproksimacija srednjeg polja pruža dobar opis ponašanja sistema.

Eksperimentalnim mjerenjima jačine GFP signala preko HILO slika u stanicama *S. pombe* (Ananthanarayanan et al., 2013) utvrđeno je da tipična stanica sadrži približno $N_{uk} = 30 \pm 20$ (srednja vrijednost \pm standardna devijacija) dineina u citoplazmi za cilindričnu stanicu s volumenom $V \approx 180 \mu m^3$, što je u skladu s rezultatima našeg modela.

3.4. Raspon optimalnog broja motora s obzirom na trenje sustava

Daljnjom analizom provjerili smo kako se periodičnost oscilacija jezgre mijenja s promjenom trenja sustava koji tvore citoplazma, dineinski motori, mikrotubuli te jezgra. Zabilježeni su sljedeći rezultati.



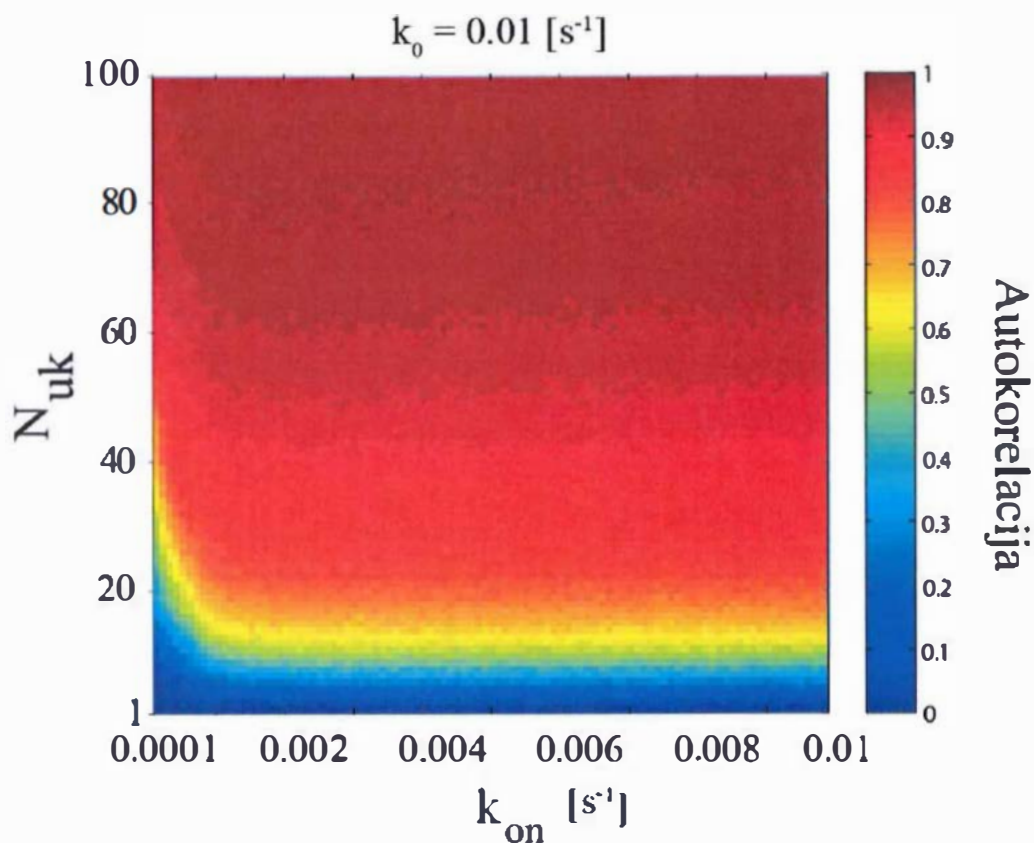
Slika 9. Raspon optimalnog broja motora za različite koeficijente trenja sustava. Sustav s nižim koeficijentom trenja ξ_1 (gore) te sustav s višim koeficijentom trenja ξ_2 (dolje)

Pri nižem koeficijentu trenja raspon optimalnog broja motora potreban za pravilne oscilacije sustava nalazi se u području između 18-35 motora. Pri višem koeficijentu trenja, raspon optimalnog broja motora potreban za pravilne oscilacije sustava nalazi se u području između 20-40 motora. Zaključujemo da se u slučaju većeg trenja između citoplazme, mikrotubula, motora te jezgre raspon optimalnog broja motora pomiče u desno, tj. za ostvarivanje pravilnih oscilacija potrebno je više generatora sile.

Zbog pojačanog trenja, sila otpora kretanju jezgre je veća te je potrebno većom silom djelovati na jezgru kako bi ona pravilno oscilirala kroz citoplazmu i stoga je ostvareni rezultat u skladu s očekivanjima.

3.5. Periodičnost oscilacija s obzirom na stopu priključivanja, k_{on}

Varirajući vrijednost stope priključivanja kon ispitali smo ovisnost periodičnosti oscilacija o stopi priključivanja k_{on} . Mijenjali smo njenu vrijednost od $k_{on} = 0.0001$ do $k_{on} = 0.1$. Mijenjali smo i ukupan broj motora prisutnih u stanici, od $N_{uk} = 1$ do $N_{uk} = 100$, te za svaku od danih kombinacija ispitali periodičnost gibanja jezgre. Rezultati su prikazani toplinskom mapom. (Slika 10)



Slika 10. Ovisnost periodičnosti oscilacija jezgre o stopi priključivanja, k_{on} .

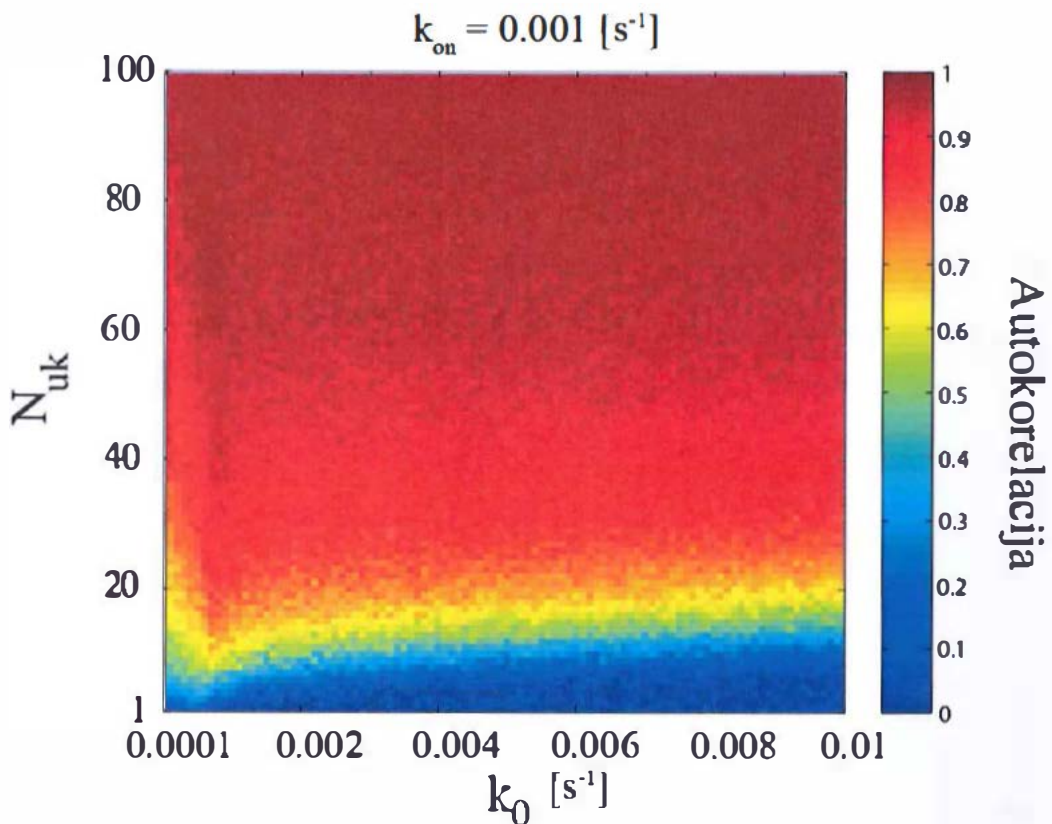
Na apscisi se nalaze vrijednosti stope priključivanja k_{on} , od vrijednosti približno jednakih nuli pa do 0.1. Na ordinati je prikazan različit broj ukupnih motora sustava N_{uk} , od 1 do 100. Različitim bojama prikazana je vrijednost drugog vrha autokorelacijske funkcije, R_{xx} koji ukazuje na pravilnost periodičnosti gibanja sustava. Pojas toplijih boja, narančasta, crvena i tamno crvena, ($R_{xx} > 0.7$), na toplinskoj skali sugerira jaku periodičnost oscilacija jezgre. Pojas hladnih boja, tamno plava i svijetlo plava, ($R_{xx} < 0.3$) ukazuje na izostanak periodičnosti oscilacija jezgre tj. na njezino neregularno kretanje. Boje prisutne između ova dva pojasa, modra, zelena i žuta, ($0.3 < R_{xx} < 0.7$) predstallaju parametarski prostor u kojem je pravilnost oscilacija jezgre dovoljno dobra.

Pri vrlo malom broju motora N_{uk} te vrlo maloj stopi priključivanja k_{on} , oscilacije jezgre su u potpunosti nepravilne. Povećavanjem ili broja motora ili stope priključivanja pravilnost oscilacija jezgre postupno se povećava. Ako su broj motora i stopa priključivanja na visokim vrijednostima unutar svojih skala, pravilnost oscilacija jezgre je izrazito visoka.

Postoji donja granična vrijednost broja dineinskih motora u stanici, $N_{uk} = 5$, potrebnih za postizanje pravilnih oscilacija, neovisna o porastu vrijednosti stope priključivanja. Iz toga je moguće zaključiti kako stanica koja sadrži ukupno 5 ili manje dineinskih motora nije u mogućnosti ostvariti pravilne oscilacije.

3.6. Periodičnost oscilacija s obzirom na konstantu otpuštanja, k_0

Istom metodom, ustvrdili smo kako promjena vrijednosti k_0 utječe na periodičnost jezgrinih oscilacija. Mijenjali smo vrijednost k_0 od $k_0 = 0.0001$ do $k_0 = 0.1$ te ukupan broj motora prisutnih u stanici od, $N_{uk} = 1$ do $N_{uk} = 100$. Za svaku vrijednost broja motora, ispitali smo periodičnost gibanja jezgre. Rezultati su prikazani toplinskom mapom. (Slika 11.)



Slika 11. Ovisnost periodičnosti oscilacija jezgre o konstanti otpuštanja, k_0 .

Na apscisi se nalaze vrijednosti konstante otpuštanja k_0 od vrijednosti približno jednakih nuli pa do 0.1. Na ordinati je prikazan različit broj ukupnih motora sustava, od 1 do 100. Različitim bojama prikazana je vrijednost drugog vrha autokorelacijske funkcije, R_{xx} koji ukazuje na pravilnost periodičnosti gibanja sustava. Pojas toplijih boja, narančasta, crvena i tamno crvena, ($R_{xx} > 0.7$), na toplinskoj skali sugerira jaku periodičnost oscilacija jezgre.

Pojas hladnih boja, tamno plava i svijetlo plava, ($R_{xx} < 0.3$) ukazuje na izostanak periodičnosti oscilacija jezgre tj. na njezino neregularno kretanje. Boje prisutne između ova dva pojasa, modra, zelena i žuta, ($0.3 \leq R_{xx} \leq 0.7$) predstavljaju parametarski prostor u kojem je pravilnost oscilacija jezgre dovoljno dobra.

Pri velikim vrijednostima konstante otpuštanja k_0 potrebne se veće vrijednosti ukupnog broja motora N_{uk} za postizanje pravilnih oscilacija. Kako se vrijednost konstante otpuštanja smanjuje, tako se smanjuje i broj motora potreban za pravilne oscilacije. To je u skladu s očekivanjima jer pri manjoj konstanti otpuštanja više motora se duže vremena zadržava na mikrotubulima.

Kada konstanta otpuštanja postigne kritičnu vrijednost $k_0 = 0.0005$, broj motora potrebnih za pravilne oscilacije poraste. Može se pretpostaviti da ako se u stanici nalazi mali broj motora $N_{uk} < 10$, a konstanta otpuštanja je vrlo mala, u određenom trenu svi motori će biti vezani za mikrotubul te neće biti izmjene nosioca sile, a time ni daljnjih oscilacija.

Metodičko poglavlje

U prirodi i u tehnici često su prisutna titranja. Promatramo li stanicu u procesu mejoze, možemo uočiti da se jezgra prije podjele periodički giba s jednog kraja stanice na drugi. Takve pravilne oscilacije najsličnije su harmonijskom titranju.

Temu svog diplomskog ispita uklopila bih u nastavnu jedinicu „*Harmonijsko titranje*“ koja se obrađuje u trećem razredu srednje škole. Očekivani ishodi ove nastavne jedinice su sljedeći:

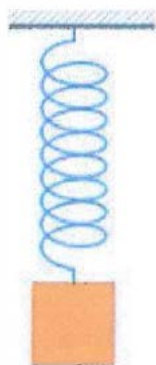
Obrazovni ishodi:	opisati harmonijsko titranje
	objasniti pojmove: ravnotežni položaj, povratna sila, elongacija, amplituda, period i frekvencija
	eksperimentalno istražiti i matematički opisati zapis harmonijskog titranja
Funkcionalni ishodi:	sposobnost logičkog zaključivanja
	sposobnost povezivanja
	razvijanje eksperimentalnih vještina
	sposobnost usmenog i pismenog izražavanja
Odgojni ishodi:	izražavanje vlastitog mišljenja
	razvijanje demokratičnosti i tolerancije tuđeg mišljenja
	razvijanje samopouzdanja i samokritičnosti
	razvijanje sistematičnosti u radu i razmišljanju

Tijek sata

Uvodni dio

POKUS:

Izvodim demonstracijski pokus. Na svom stolu imam uteg, univerzalni stalak na kojem je obješena opruga te je na oprugu obješen uteg. Pomaknem uteg iz ravnotežnog položaja te ga pustim da titra na opruzi.



Kako se uteg giba, po kakvoj putanji?

→ Uteg se giba gore-dolje.

Kako se mijenja položaj utega?

→ Ovim pitanjem i drugim potpitanjima usmjeravam učenike na periodičnost i stalno ponavljanje gibanja

Označite krajnje položaje utega.

→ Netko od učenika pomoću kvačica označi krajnje položaje dok uteg titra.

Zaustavim uteg i pustim ga da miruje na opruzi.

Gdje se nalazi uteg s obzirom na naznačene krajnje položaje?

→ Ovim pitanjem uvodim pojam ravnotežnog položaja.

Koji uvjet mora biti ispunjen da tijelo miruje?

→ Zbroj sila na tijelo jednak je nuli.

Uteg ponovno pustim da se giba

Kakva je putanja utega s obzirom na ravnotežni položaj?

→ Uteg titra oko ravnotežnog položaja.

Zašto se uteg giba prema ravnotežnom položaju?

→ Zbog djelovanja opruge elastičnom silom.

U kojem smjeru djeluje elastična sila?

→ Suprotno smjeru pomaka od ravnotežnog položaja.

Tu silu koja vraća tijelo u ravnotežni položaj zovemo povratna sila.

Glavni dio

Kojom veličinom možemo opisati gibanje utega?

→ Pomak od ravnotežnog položaja.

Tu veličinu zovemo elongacija.

U kojim točkama opruga ima maksimalnu elongaciju?

→ U označenim, krajnjim točkama.

Uvodim amplitudu kao maksimalnu elongaciju kod titranja.

Postoji li neko karakteristično vrijeme kod ovakvog gibanja?

Kako bi nazvali vrijeme nakon kojeg se ponavlja događaj?

→ Ovime uvodim period titranja. Ako je potrebno, podsjećam učenike na kružno gibanje koje su radili u 1. razredu.

Prije mjerenja perioda s učenicima provodim sljedeću diskusiju:

Kako biste izmjerili period titranja?

→ Učenici osmišljavaju pokus.

Možete li mjeriti samo jedan titraj?

→ Rasprava o preciznosti mjerenja

POKUS:

Učenici su podijeljeni u skupine. Na stolu imaju univerzalni stalak s oprugom i utegom te zaporni sat. Provedeći po 10 mjerenja učenici određuju period titranja dane opruge te rezultate zapisuju u bilježnice. Provjeravam metodu mjerenja te računski postupak prilazeći svakoj grupi.

S učenicima komentiram rezultate.

Kako bi smanjivanje perioda utjecalo na gibanje utega?

→ Uteg bi češće prolazio kroz ravnotežni položaj te brže obavljao jedan titraj.

Što bi se u tom slučaju dogodilo s brojem titranja u npr. 10 s?

→ Broj titraja bi se povećao.

Kako se naziva broj titraja u određenom vremenskom intervalu?

→ Frekvencija.

Kakav je odnos perioda i frekvencije?

→ Period i frekvencija odnose se obmuto proporcionalno.

$$f = \frac{1}{T} \text{ [s}^{-1}\text{]}$$

Molim vas izračunajte i frekvenciju titranja utega.

Osim vremena i frekvencije titranja tijela, zanima nas kako bismo još mogli opisati titranje tijela. Kako biste uz pomoć opreme koja se nalazi na stolu (jednostavno njihalo s pijeskom, univerzalni stalak i milimetarski papir) ostvarili zapis putanje njihala?

POKUS:



Učenici su podijeljeni u skupine. Svakoj skupini dan je univerzalni stalak s pričvršćenim jednostavnim njihalom s pijeskom. Učenici puštaju njihalo da se giba te pri tome jednoliko vuku milimetarski papir koji se nalazi ispod njihala i time ostvaruju zapis putanje njihala.

Učenici skiciraju ostvarenu putanju u svoje bilježnice te označavaju elongaciju i amplitudu.

→ Grafički prikaz ovisnosti elongacije o vremenu.

Kojom matematičkom funkcijom biste opisali putanju utega?

→ Učenike vodim na zapis $x(t) = A \cos(\omega t)$

Razjašnjavam s učenicima ω .

$$\omega = \frac{2\pi}{T}$$

Kružna frekvencija jednaka umnošku punog kuta u radijanima i frekvencije titranja.

Koja bi još funkcija mogla poslužiti za opis titranja?

→ Sinus.

Po čemu su slične, a po čemu različite funkcije sinus i kosinus?

→ Funkcije sinus i kosinus imaju isti period, a razlikuju se po pomaku u fazi.

Ovisno o tome kako smo zatitrali uteg za opis titranja koristimo jednu ili drugu funkciju.

Završni dio

Možete li povezati ovakvo titranje s ponašanjem sustava prirodi?

→ Učenici povezuju znanje o harmonijskom titranju s procesima iz prirode, titranju bubnjića uha, električnih krugova, amortizera u automobilu.

Na sličan način u profazi mejoze titra jezgra u stanici. U jednom periodu jezgra prelazi duljinu cijele stanice, a njegovo trajanje je između 5 i 10 minuta.

Zaključak

U prvoj inačici stohastičkog modela oscilacija jezgre *S. pombe* tijekom profaze mejoze, citoplazmatski rezervoar smatramo neograničenim te je promatrani sustav neovisan o ukupnom broju dineinskih motora prisutnih u stanici. Nakon izvedenih stohastičkih simulacija zaključili smo da je u slučaju neograničenog rezervoara utjecaj stohastičkih efekata zanemariv te je podudarnost stohastičkog modela i modela aproksimacije srednjeg polja izrazito visoka.

Budući da u stvarnim biološkim sustavima broj dineinskih motora nije beskonačan, potrebno je poboljšati model uvođenjem ograničenog rezervoara. U drugoj inačici stohastičkog modela ograničavamo rezervoar te promatramo utjecaj ukupnog broja motora na periodičnost oscilacija jezgre. Na temelju izvedenih stohastičkih simulacija može se zaključiti da uz velik broj dineinskih motora jezgra oscilira periodično, a njezine oscilacije su robusne. Nasuprot tome, generirajući male vrijednosti ukupnog broja motora, jezgrine oscilacije više nisu robusne te njihova periodičnost trne.

Metodom autokorelacije odredili smo broj dineinskih motora nužno potreban za postojanje pravilnih periodičnih oscilacija. S obzirom na to da stanica ima ograničen izvor resursa za produkciju staničnih motora, očekivano je da će težiti optimizaciji njihovog broja, a da pri tom i dalje očuva pravilnost oscilacija nužnih za sparivanje kromosoma, pravilnu izmjenu genetskog materijala te održivost spora.

Daljnjom analizom zaključili smo o utjecaju trenja sustava na pravilnost periodičnosti oscilacija jezgre te o vrijednostima stope priključivanja dineinskih motora na mikrotubul te konstante otpuštanja dineinskih motora s mikotubula u citoplazmu.

Rezultat ovog rada sugerira da se optimalan broj dineinskih motora kreće u rasponu od 20 do 40. Eksperimentalnim mjerenja utvrđeno je da tipična stanica sadrži približno $N_{uk} = 30 \pm 20$ dineina u citoplazmi što se slaže s našim rezultatima. Iz ovog slijedi da je postojeću sliku o ponašanju molekularnih motora danu u aproksimacije srednjeg polja potrebno proširiti stohastičkim modelom s ograničenim rezervoarom.

Povećavanjem trenja sustava povećava se sila koja se opire gibanju jezgre, a time optimalan broj motora potrebnih za postizanje pravilnih oscilacija. Ispitivanjem parametarskog prostora mijenjanjem vrijednosti stope priključivanja k_{on} ustvrdili smo da

postoji donja granična vrijednost broja dineinskih motora u stanici, $N_{uk} = 5$, potrebnih za postizanje pravilnih oscilacija, neovisno o porastu vrijednosti stope priključivanja.

Ispitujući parametarski prostor mijenjajući konstantu otpuštanja k_0 uočili smo da broj motora potrebnih za pravilne oscilacije raste kako konstanta k_0 raste te se smanjuje kako se konstanta k_0 smanjuje. Kada se konstanta k_0 smanji ispod određene kritične vrijednosti k_0 broj motora potrebnih za pravilne oscilacije više se ne smanjuje nego naglo poraste. Ovakvo ponašanje moguće je objasniti izostankom oscilacija zbog vezivanja svih prisutnih motora u stanici i njihovog ne otpuštanja s mikrotubula zbog preslabe konstante otpuštanja.

Uz potrebne preinake, ovaj model moguće je primijeniti i u drugim znanstvenim radovima čija se istraživanja temelje na biološki sličnim promatranim sustavima. S obzirom na to da je citoplazmatski dinein molekularni motor koji se nalazi u mnogim eukariotskim stanicama, okvir koji se koristi u ovom radu ima veliku mogućnost primjene i u drugim organizmima, uključujući i ljude.

Literatura

Ananthanarayanan V, Schattat M, Vogel SK, Krull A, Pavin N, Tolic-Norrelykke IM (2013) Dynein motion switches from diffusive to directed upon cortical anchoring *Cell* **153**, 1526-1536

Bajer AS (1982) Functional autonomy of monopolar spindle and evidence for oscillatory movement in mitosis *J Cell Biol* **93**, 33

Burakov A, Nadezhdina E, Slepchenko B, Rodionov V (2003) Centrosome positioning in interphase cells *J Cell Biol* **162**, 963–969

Campas O, Sens P (2006) Chromosome oscillations in mitosis. *Phys Rev Lett* **97**: 128102

Chikashige Y, Ding DQ, Funabiki H, Haraguchi T, Mashiko S, Yanagida M, Hiraoka Y (1994) Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast *Science* **264**, 270

Civelekoglu-Scholey G, Sharp DJ, Mogilner A, Scholey JM (2006) Model of chromosome motility in *Drosophila* embryos: adaptation of a general mechanism for rapid mitosis *Biophys J* **90**, 3966

Coppin CM, Pierce DW, Hsu L, Vale RD (1997) The load dependence of kinesin's mechanical cycle *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 8539

Ding DQ, Yamamoto A, Haraguchi T, Hiraoka Y (2004) Dynamics of homologous chromosome pairing during meiotic prophase in fission yeast *Dev Cell* **6**, 329

Eshel D, Urrestarazu LA, Vissers S, Jauniaux JC, van Vliet-Reedijk JC, Planta RJ, Gibbons IR (1993) Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11172–11176

Fink G, Schuchardt I, Colombelli J, Stelzer E, Steinberg G (2006) Dynein-mediated pulling forces drive rapid mitotic spindle elongation in *Ustilago maydis* *Embo J* **25**, 4897

Gennerich A, Carter AP, Reck-Peterson SL, Vale RD (2007) Force-induced bidirectional stepping of cytoplasmic Dynein. *Cell* **131**: 952–965.

Gillespie DT (1977) Exact Stochastic Simulation of Coupled Chemical Reactions *The Journal of Physical Chemistry* **81** (25): 2340–2361

Grill SW, Kruse K, Jülicher F (2005) Theory of mitotic spindle oscillations *Phys Rev Lett* **94**, 108104.

Gönczy, P, Pichler, S, Kirkham, M, and Hyman, AA (1999) Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo *J Cell Biol* **147**, 135–150

Joglekar AP, Hunt AJ (2002) A simple, mechanistic model for directional instability during mitotic chromosome movements *Biophys J* **83**, 42–58

Kimura K, Kimura A (2011) Intracellular organelles mediate cytoplasmic pulling force for centrosome centration in the *Caenorhabditis elegans* early embryo *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 137–142

Kozlowski C, Srayko M, Nedelec F (2007) Cortical microtubule contacts position the spindle in *C. elegans* embryos *Cell* **129**, 499–510

Laan L, Pavin N, Husson J, Romet-Lemonne G, van Duijn M, Lopez MP, Vale RD, Jülicher F, Reck-Peterson SL, Dogterom M (2012) Cortical dynein controls microtubule dynamics to generate pulling forces that position microtubule asters *Cell* **148**, 502–514

Li YY, Yeh E, Hays T, Bloom K (1993) Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 10096–10100

O'Connell CB, Wang YL (2000) Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion *Mol Biol Cell* **11**, 1765–1774

Palazzo AF, Joseph HL, Chen YJ, Dujardin DL, Alberts AS, Pfister KK, Vallee RB, Gundersen GG (2001) Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization *Curr Biol* **11**, 1536–1541

Pavin N, Laan L, Ma R, Dogterom M, Jülicher J (2012) Positioning of microtubule organizing centers by cortical pushing and pulling forces *New J Phys* **14**, 105025

Pecreaux J, Roper JC, Kruse K, Jülicher F, Hyman AA, Grill SW, Howard J (2006) Spindle oscillations during asymmetric cell division require a threshold number of active cortical force generators *Curr Biol* **16**, 2111–2122

Rieder CL, Davison EA, Jensen LC, Cassimeris L, Salmon ED (1986) Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle *J Cell Biol* **103**, 581

Skop, AR, and White, JG (1998) The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early *Caenorhabditis elegans* embryos *Curr Biol* **8**, 1110–1116

Toba S, Watanabe TM, Yamaguchi-Okimoto L, Toyoshima YY, Higuchi H, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**, 5741 (2006)

Toral R, Colet P (2014) Master in Physics of Complex Systems: Stochastic Numerical Methods. Chap. 8, 235

Tolic-Norrelykke IM (2010) Force and length regulation in the microtubule cytoskeleton: lessons from fission yeast *Curr Opin Cell Biol* **22**, 21-28

Tolic-Norrelykke IM, Munteanu EL, Thon G, Oddershede L, Berg-Sorensen K (2004) Anomalous diffusion in living yeast cells. *Phys Rev Lett* **93**: 078102.

Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE (2004) Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport *J Neurobiol* **58**, 189-200

Varma D, Monzo P, Stehman SA, Vallee RB (2008) Direct role of dynein motor in stable kinetochore-microtubule attachment, orientation, and alignment *J Cell Biol* **182**, 1045-1054

Vogel, SK, Pavin, N, Maghelli, N, Jülicher, F, and Tolić-Nørrelykke, IM (2009) Self-organization of dynein motors generates meiotic nuclear oscillations *PLoS Biol* **7**, e1000087

Winston, WL (2004) Operations research, Applications and algorithms, Thomson learning, Brooks/Cole.

Wojcik E, Basto R, Serr M, Scaerou F, Karess R, Hays T (2001) Kinetochore dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein *Nat Cell Biol* **3**, 1001-1007

Yamamoto A, West RR, McIntosh JR, Hiraoka Y (1999) A cytoplasmic dynein heavy chain is required for oscillatory nuclear movement of meiotic prophase and efficient meiotic recombination in fission yeast *J Cell Biol* **145**, 1233